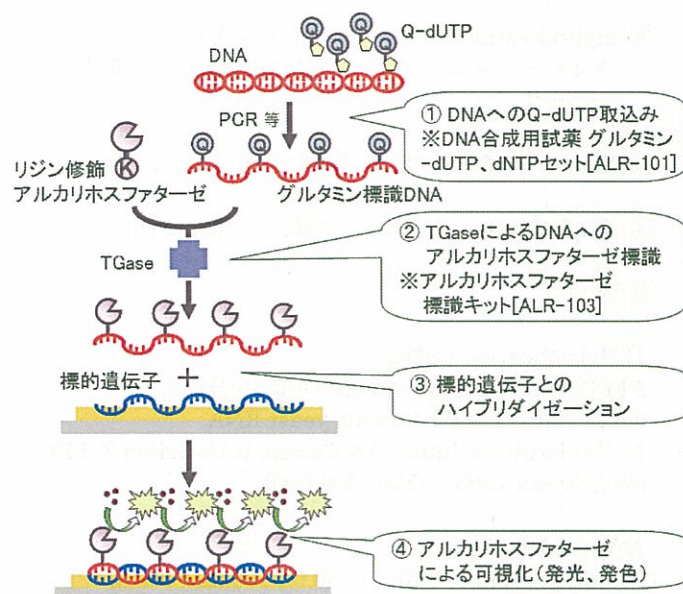
初版：20101203
RN1-3761Rev.0

ALOKA
Labelling ONE

DNA 合成用試薬 グルタミン-dUTP、dNTP セット 取扱説明書

ALR-101　　保存温度 −20℃

注意
1. 本製品には毒性のある物質は含まれておりませんが、万が一、試薬が皮膚や目に付着、あるいは口内に入った場合は流水で洗い流してください。
2. 取扱説明書の使用上の注意に従って使用してください。

【概要】
本製品は、グルタミン残基（Q）が標識された DNA を合成するためのデオキシリボヌクレオチドセットです。
本製品添付の Q-dUTP は塩基にグルタミン残基が修飾された dUTP（分子量 841）であり、一般的な DNA polymerase を用いて DNA へ取込むことができます。Q-dUTP が取込まれた DNA はアルカリホスファターゼ標識キット [ALR-103] によってアルカリホスファターゼを標識することができ、サザンブロッティングなどの検出用プローブとして使用することが出来ます。

【内容】
本製品は、5 本の試薬からなります。

試薬名	濃度	容量
dATP	2 mM	30 μL
dCTP	2 mM	30 μL
dGTP	2 mM	30 μL
dTTP	1 mM	60 μL
Q-dUTP	1 mM	24 μL

注 1) 本製品には DNA polymerase 及び反応バッファーは含まれておりません。
注 2) dTTP、Q-dUTP の濃度が 1 mM となっております。

【包装】
20 反応用
（取扱説明書記載の反応を実施した場合）

【保存方法】
-20℃にて保存してください。

【使用期限】
製品到着日より 6 ヶ月
（但し、未開封かつ-20℃にて保存の場合）
開封後はなるべくお早めにご使用ください。

【使用上の注意】
① 本製品をご使用の際には、取扱説明書をご一読の上、使用してください。
② 本製品は、研究用試薬です。臨床診断用には使用しないでください。
③ 本製品には毒性のある物質は含まれておりませんが、万が一、試薬が皮膚や目に付着、あるいは口内に入った場合は流水で洗い流してください。
④ 使用期限が切れた製品を使用しないでください。使用期限が切れた製品を使用した場合には反応が正確に行えない可能性があります。
⑤ 反応液の調製は氷上で行ってください。氷上で行わない場合には反応が正確に行えない可能性があります。
⑥ PCR 産物の精製は精製カラムの使用を推奨します。Q-dUTP の疎水性が高いため、一般的なエタノール沈殿による精製法では未反応の Q-dUTP が沈殿し、取除けない場合があります。

【反応に必要な試薬、機器】

試薬、機器	
DNA polymerase	以下製品を推奨しております。 ・KOD Dash (LDP-101/TOYOBO) ・KOD -Plus- (KOD-201/TOYOBO) ・Ex Taq (RR001A/TaKaRa)
10 x Buffer	DNA polymerase 添付の Buffer
Water (PCR グレード)	(反応液調製用)
精製カラム	(PCR 産物精製用) 以下製品を推奨しております。 ・MinElute PCR Purification Kit(#28004/Qiagen) ・QIAquick PCR Purification Kit(#28104/Qiagen)
サーマルサイクラー	(PCR 用)
分光光度計	(PCR 産物濃度確認用)
アガロースゲル電気泳動装置	(PCR 産物濃度確認用)

初版：20101203
RN1-3761Rev.0

【使用方法】

(1) PCR　反応液の調製

① 氷上でPCRチューブに下表の試薬を加えてください。
② 反応液を十分混合し、スピンダウンしてください。
③ PCR チューブをサーマルサイクラーにセットしてください（PCR サイクル条件はご使用のサンプル、polymerase に合った条件をご使用ください）。

組成	容量	終濃度
10 x Buffer	1.5 μL	1 x
テンプレート DNA	～15 ng	～1 ng/μL
プライマー F（10 μM）	0.3～1.5 μL	0.2～1.0 μM
プライマー R（10 μM）	0.3～1.5 μL	0.2～1.0 μM
dATP (2 mM)	1.5 μL	0.2 mM
dCTP (2 mM)	1.5 μL	0.2 mM
dGTP (2 mM)	1.5 μL	0.2 mM
dTTP (1 mM)	1.8 μL	0.12 mM
Q-dUTP (1 mM)	1.2 μL	0.08 mM
DNA polymerase	0.5 μL	0.5～1.25 U/反応
Water	to 15 μL	

メモ：dTTP と Q-dUTP の割合は標識率と収量から dTTP: Q-dUTP = 60:40 を推奨しております。

(2) PCR 産物の精製

① 使用する精製カラムのマニュアルに従って PCR 産物を精製ください。

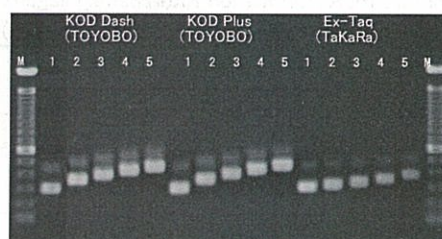
メモ：Q-dUTP の疎水性が高いため、一般的なエタノール沈殿による精製法では未反応の Q-dUTP が沈殿し、取除けない場合があります。

(3) PCR 産物の濃度確認

① 精製後の PCR 産物の濃度をアガロースゲル電気泳動または吸光度測定等によりご確認ください。

メモ：アルカリホスファターゼ標識キット[ALR-103] によるアルカリホスファターゼ標識に 400 ng の PCR 産物を使用します。

【Q-dUTP 取り込み確認】

PCRによるQ-dUTPの取り込みをアガロースゲル電気泳動で確認できます。以下は、dTTP と Q-dUTP の比率を変えて、300 bp の領域を PCR で増幅した産物をアガロースゲル電気泳動した例です。Q-dUTP の比率に応じて分子量が大きくなっていることが確認できます。

【使用例】

～ドットブロットハイブリダイゼーション（DNA）～

◎PCR

① PCR 反応液の調製（左記）に従って反応
↓
② PCR 産物を 30 μL にメスアップし、QIA quick PCR Purification kit（Qiagen）を用いて精製
↓
③ 専用の溶出バッファー30 μL で溶出
↓
④ アガロースゲル電気泳動による濃度確認

◎アルカリホスファターゼ標識反応

⑤ アルカリホスファターゼ標識反応（40℃、30 分間、反応組成はアルカリホスファターゼ標識キット [ALR-103] 取扱説明書に従う）
↓
⑥ Stop solution を 4 μL 加え、TGase の反応を停止

◎ハイブリダイゼーション

⑦ Hybridization Buffer [1)]でプレハイブリダイゼーション（55℃、30 分間）
↓
⑧ Hybridization Buffer [1)] にプローブを加えてハイブリダイゼーション（プローブ濃度 10 ng/mL、55℃、オーバーナイト）
↓
⑨ Wash 1 Buffer [2)]で洗浄（55℃、10 分間、2 回）
↓
⑩ Wash 2 Buffer [3)]で洗浄（室温、5 分間、2 回）
↓
⑪ 検出

1) Hybridization Buffer：
2 M Urea, 20 mM phosphate buffer (pH8.0), 0.5 M NaCl, 1 mg/mL torula yeast RNA, 1× Denhardt's solution, 1% Casein, 0.1% Triton X-100, 5% Dextran sulfate (MW: 500,000)

2) Wash 1 Buffer：
50 mM phosphate buffer (pH8.0), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100

3) Wash 2 Buffer：
100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH9.5), 50 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100

【廃棄方法】

本製品には、ポリスチレン（ケース）、ポリプロピレン（試薬チューブ）、紙（取扱説明書）を用いています。廃棄の際は分別し、都道府県・市町村が定める廃棄物の処理法に従って廃棄してください。

製造販売元
アロカ株式会社
〒181-8622 東京都三鷹市牟礼 6 丁目 22 番 1 号
計測システム営業部　(0422)45-5131
http://www.aloka.co.jp
e-mail: bio@aloka.co.jp